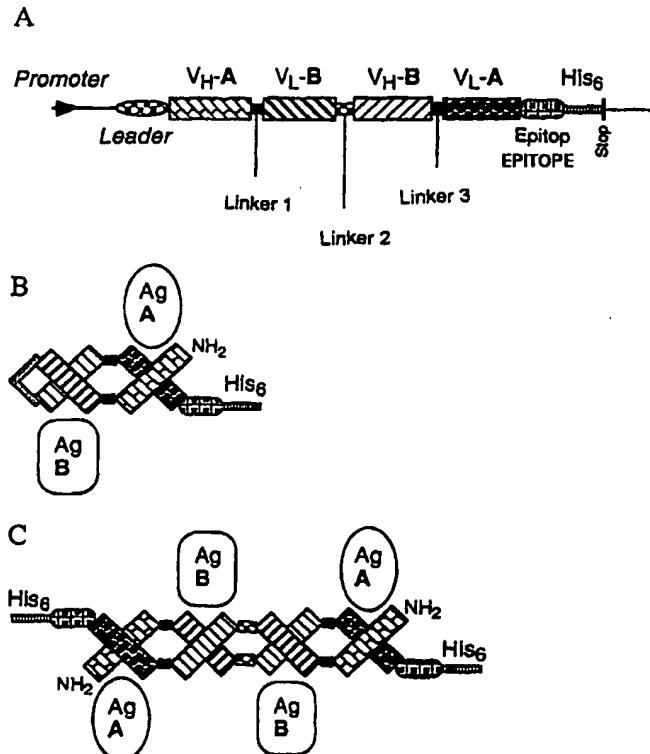


PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57150 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Titel: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS</p> <p>(54) Bezeichnung: MULTIVALENT ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.</p>		



BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mail	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CR	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v -Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H - und zwei V_L -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H - und einer V_L -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2

einsetzbar macht.

Erfnungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimères vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes, F_v -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfnungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzel-

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

3

kettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstrukttes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH₂-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstrukttes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G₄S)₄, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4

Ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v -Antikörper-Konstrukt kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 6 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_v-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, pPIC-DISC-SL, pDISC5-LL und pDISC6-SL. Die ersten vier wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des Weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stopcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird; His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stopcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt λ-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β-

Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt *lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectalyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

7

Saccharomyces cerevisiae- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 9 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC5-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Repressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 10 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC6-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Re-

pressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-aCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCA-CACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTGGGTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *Eco*RI und *Eco*RV gespalten und mit dem mit *Eco*RI/*Eco*RV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L -Domäne von Anti-CD19,

gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinylschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCA, und DP4, 5'-AGCA-CACTCTAGAGACACACAAGATCTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-T A C T G C A G C T G C A C C T G G C T A C C C A C C A C - CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCCACCACCAAC-AGCGGCCGCAGCATCAGCCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄Ser)₄-Inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Nde*/PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Nde*/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevi-*

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

10

siae α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, Zeocin™, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5'-PIC, 5'-CCGTGAAT-TCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBN 5'-GGTC-GACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Eco*RI und *Xba*I gespalten und in mit *Eco*RI/*Xba*I linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit *Eco*RI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *Xba*I gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *Nco*I gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *Xba*I wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli/XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden

über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtkulturen in 2xYT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1ständigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976,

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

12

Anal. Biochem., 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten ε^{1mg/ml} = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 µg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit S₁d linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 µg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Röhren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Röhren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

13

Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 x 10⁶ Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myοMak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard[⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 x 10⁶ Zielzellen wurden mit 200 µCi

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

14

Na[⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 x 10⁵/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 x 10⁶/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 10⁴ Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [⁵¹Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100.

Beispiel 6: Konstruktion der Plasmide pDISC5-LL und pDISC6-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien durch Hoch-Zelldichte-Fermentation

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, die das hok/sok Plasmid-freie Zell- "suicide"-System und ein Gen enthielten, das für den Skp/OmpH periplasmatischen Faktor für eine größere Herstellung rekombinanter Antikörper kodiert. Das skp Gen wurde durch PCR mittels der Primer skp-1, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G und skp-2, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G unter Verwendung des Plasmids pGAH317 (Holck and Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit AflII und HindIII gespalten und in das mit AflII/HindIII linearisierte Plasmid pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) inseriert, wodurch der Vektor pSKK erhalten wurde. Die in den Plasmiden pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL enthaltenen und für die scFv-Antikörper-Konstrukte kodierenden Gene wurden durch PCR mittels der Primer fe-

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

15

1, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC und fe-
2, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G
amplifiziert. Die XbaI/AfIII gespaltenen PCR-Fragmente wurden in pSKK vor dem
5 skp Insert inseriert, wodurch die Expressionsplasmide pDISC5-LL bzw. pDISC6-SL
erhalten wurden, die tri-cistronische Operons unter der Kontrolle des lac
Promotor/Operator-Systems enthalten (vgl. Fig. 9, 10).

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

16

K 2675

Patentansprüche

- 5 1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
- 10 2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 - 10 Aminosäuren aufweisen.
- 15 3. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
- 20 4. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
- 25 5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20 Aminosäuren aufweist.
- 30 6. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.
7. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10 Aminosäuren aufweist.
9. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

17

10. F_v -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v -Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
 11. F_v -Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v -Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
5
 12. F_v -Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v -Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v -Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem
15 Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivale F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
- 20 15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
- 25 17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC5-LL.
- 30 20. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC6-SL.

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

18

21. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

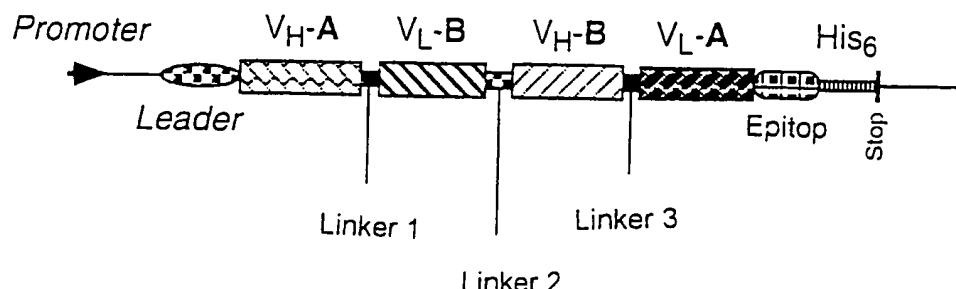
5

WO 99/57150

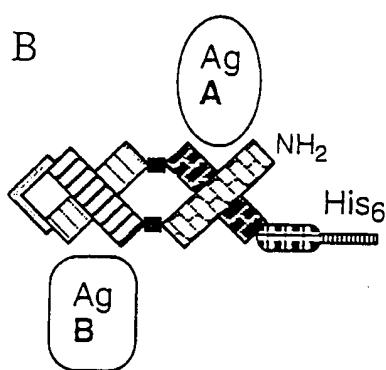
PCT/DE99/01350

1/10

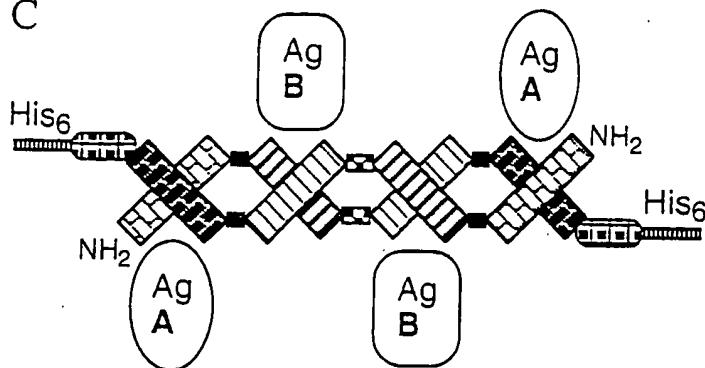
A



B



C

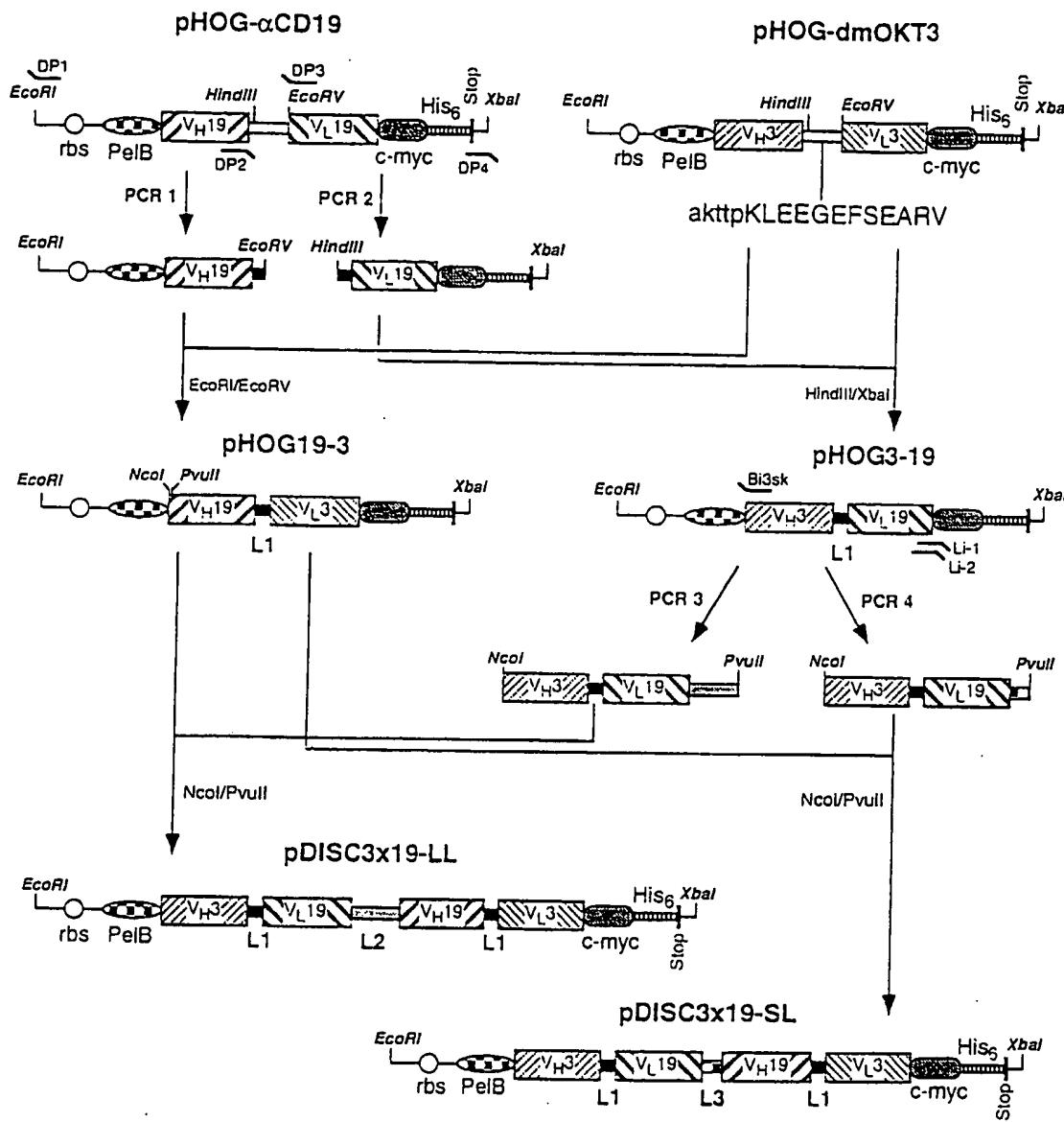


FIGUR 1

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2/10

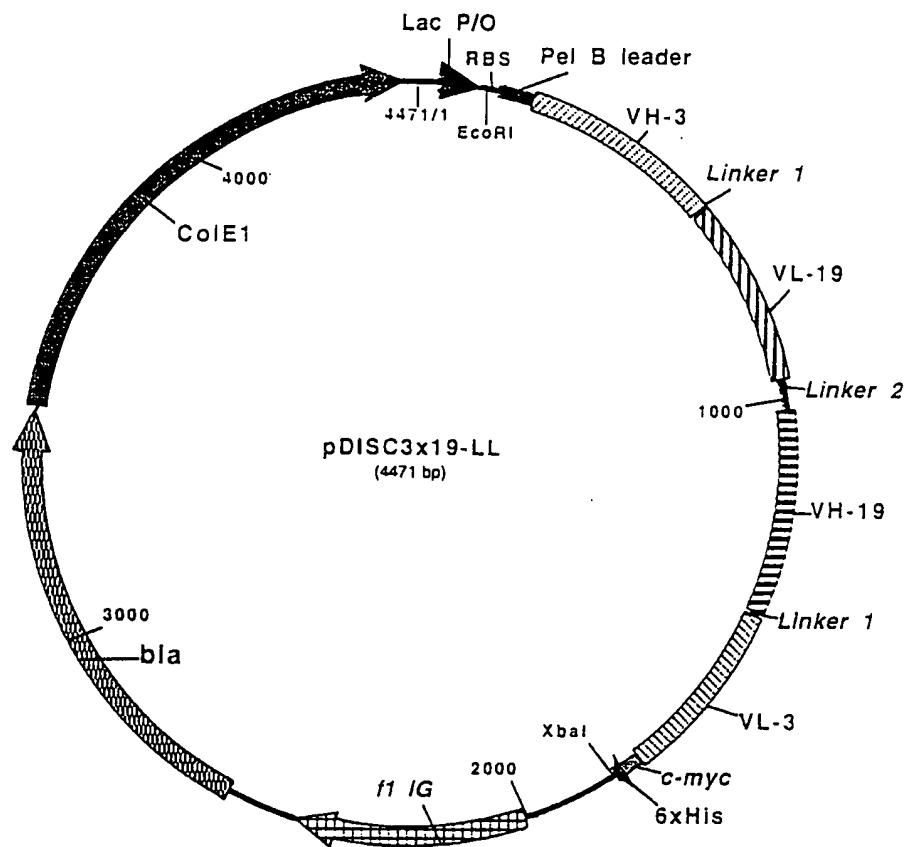


FIGUR 2

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

3/10

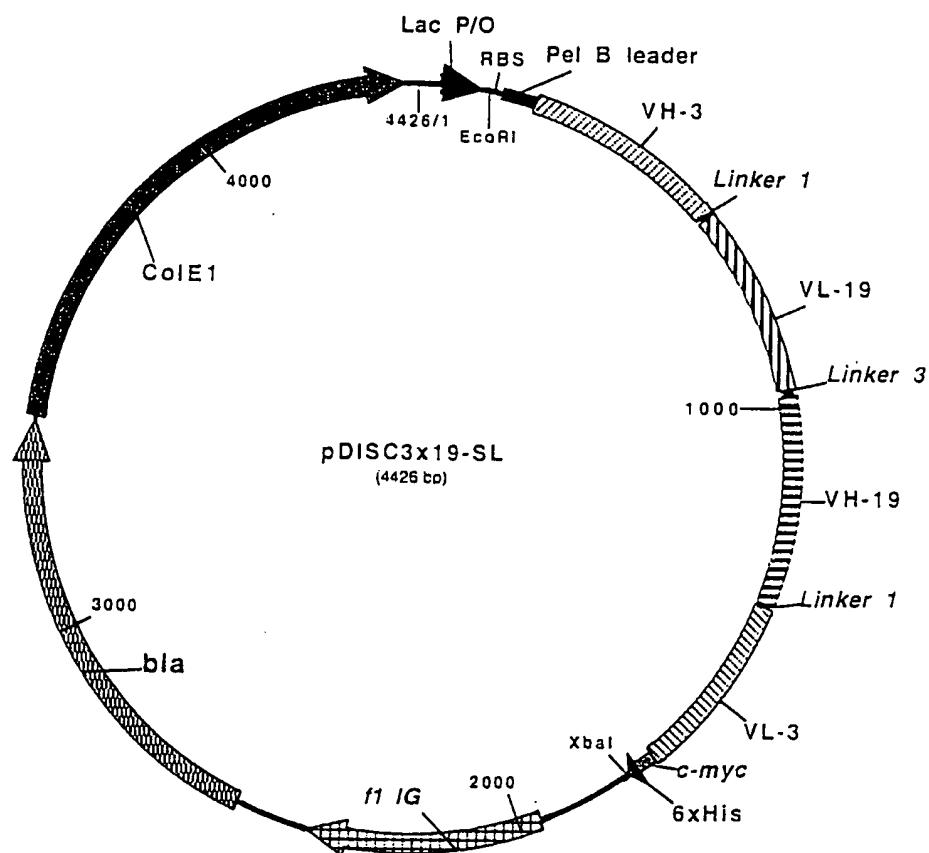


FIGUR 3

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4/10



FIGUR 4

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

5 / 10

NcoI

EcoRI	RBS	PelB leader	
1	<u>GAATTCTTAAAGGAGAGAATT</u>	<u>TTACCACTGAAATCTCTTGGCCTACGGCAGCCGCTGGCTGCTGCTGCTGCGACGCTAGCGCGCATG</u>	
		1' M K Y Y I C F T A A A S I L E L L A A Q P A M	
		Frame-CH1	VH anti-CD3
92	<u>CCGAGGTGCAACTGCAGCAGTCGCGCTGAACTGGCAGACCTGGGCTCTAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTCTGGCTACACCTTAC</u>		
22	A Q V Q L Q Q S G A E D A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T		CDR-H1
183	<u>TAGGTACACGATGCACTGGTAAAGCAGGCGCTGGCAGGGCTGGCAATGGATTGGATACTTAACTCTAGCCGTGGTTATAC</u>		Frame-H2
52	R Y T M H N V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T		CDR-H2
267	<u>TAATTACAATCAGAAGTTCAGGACAAGCCGAGCTTGACTCAGCAGAACCTCTCAGCACGCCAACCTGCAACTGAGCAGCTGAC</u>		Frame-H3
30	N Y N Q K F K C K A T L T D K S S S T A Y N Q L S S E T		CDR-H3
354	<u>ATCTGAGGACTCTGCAGTCTTACTCTGCGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTCCCGCAACRCCACTCTCA</u>		Frame-H4
109	S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S I C D Y W G Q G T T L		CH1
440	<u>CGTCTCTCTCGCTAAACACGACCGAGCTGGCGGTGCTATCTGCTACCCAACTCCAGCTTCTTCTGGCTCTCTTCTGGGCTAGG</u>		Linker 1
138	T V S S A K T T F K L G G D I E L T Q T P A S L A V S E L G Q		Frame-L1
530	<u>GGGCCACCATCTCTCGCAAGGCCGCGAACAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTGAACTGTACCAAGCAGATTCAGGAC</u>		CDR-L1
168	R A T I S C K A S C S V D Y D G D S Y L N W Y Z Q I F G		Frame-L2
614	<u>AGCCTCCGAAACTCTCATCTATGATGATCCAAATCTAGTTTCTGGGATCCCGCGGGTTAGTGCCTGCGGTCTGGAGCAGACT</u>		CCR-L2
196	Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F		Frame-L3
702	<u>CACCTGAACTTCCATCTCTGGCGAGAGTCGATCTGCAACCTATCATGTCAGCAAGACTGAGGATCCCTGGCCTGGGAG</u>		CDR-L3
225	T L N I H P V E X V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G		Frame-L4
	C kacca	NotI	Linker 2
790	<u>GGCCTCCAGCTGGAAATCAGACCGCCCTCTGGCTGGCTGGTGGTTCTGGCGGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGC</u>		PvuII
255	G T R E I Y K R A D A A A A G G G G G G S G G G G G G G G		Frame-H1
874	<u>TCCGGTGGTGGTGGTAGCCGGTGGCAGTCAGCTGGGGCTGAGCTGGTAGGCGCTGGCTCTCTGAGAAGATTTCTGCTAGG</u>		VH anti-CD19
283	S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K		CDR-H1
962	<u>CTTCTGGCTATGCAATTCACTGAGCTACTGGGAACTGGTGAAGCAGGCGCTGGACAGGGCTCTGAGTGCATTGGACAGAATTGGC</u>		Frame-H2
312	A S G Y A F S S Y N M N W V K Q R P G Q G L E W E G Q I W		CDR-H2
	PsII	Frame-H3	
1049	<u>CTGGAGATGGTGTACTAACTACAATGGAAAGTTCCTAGGGTAAACCCACTCTGACTCTGAGACGACGGTAGGGCGTTATTACTAT</u>		CDR-H3
341	P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y		Frame-H4
1113	<u>TGGACTCTGGAGCCCTACCATCTGAGGCTCTCTGGCTCTATTCTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGGCGTTATTACTAT</u>		CH1
369	M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y		Linker 1
1219	<u>GCTATGGACTACTGGGCTCAAGGACCTCTGTCAGCTCCGCTCTCTGCGCAAGCTGGGGTGATCTGCTCTACCTC</u>		Frame-L1
398	A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T		CDR-L3
1307	<u>AGCTCTGAGCTCTCTGCTGCTGCTGGGAGAGGGTCACCTGACCTGAGCTGAGTCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACCTG</u>		VL anti-CD3
427	Q S P A T I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N N		Frame-L2
1393	<u>TACCAAGGAGACTCAAGGACCTCCCGGAGAGATGGATTATGACACACATCGAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCTGAGGGCA</u>		CDR-L2
456	Y Q Q K S G T S P R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G		Frame-L3
1481	<u>GTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTGAGCTACGGGCGATGGAGGCTGAAGTGTGCACTTATTACTGCGACGGTAGGGAGTAGTAA</u>		CKappa
485	S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N		c-myc epitope
	Frame-L4		
1569	<u>CCCATTCACTGCTGGCTGGGAGAGCTGGTAATAACCGGCTCTGAGCTGAGCTGGATCCGAGACAAAAGCTGATCTCAG</u>		His6 tail
514	P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S		XbaI
1655	<u>AAGAAGACCTAAACTCTGAGCTCTCTGAGCTAACTCTAGA</u>		
543	E E D L N S H H H H .		

FIGUR 5

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

6 / 10

FIGUR 6

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

7/10

941 ATGAGATTCCTCAATTCTTACTGCTGTTTATCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T
alpha-factor signal
1015 AACAGAACATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTAGAAGGGGATTCGATG
25 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D
1089 TTGCTGTTTGGCATTTCACACAGCACAAATAACGGTTATTGTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50 V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A
XbaI * EcoRI
1163 GCTAAAGAAGAAGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75 A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S
VH anti-CD3
1234 TGGGGCTGAACGGCAAGACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98 G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGURE 7

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

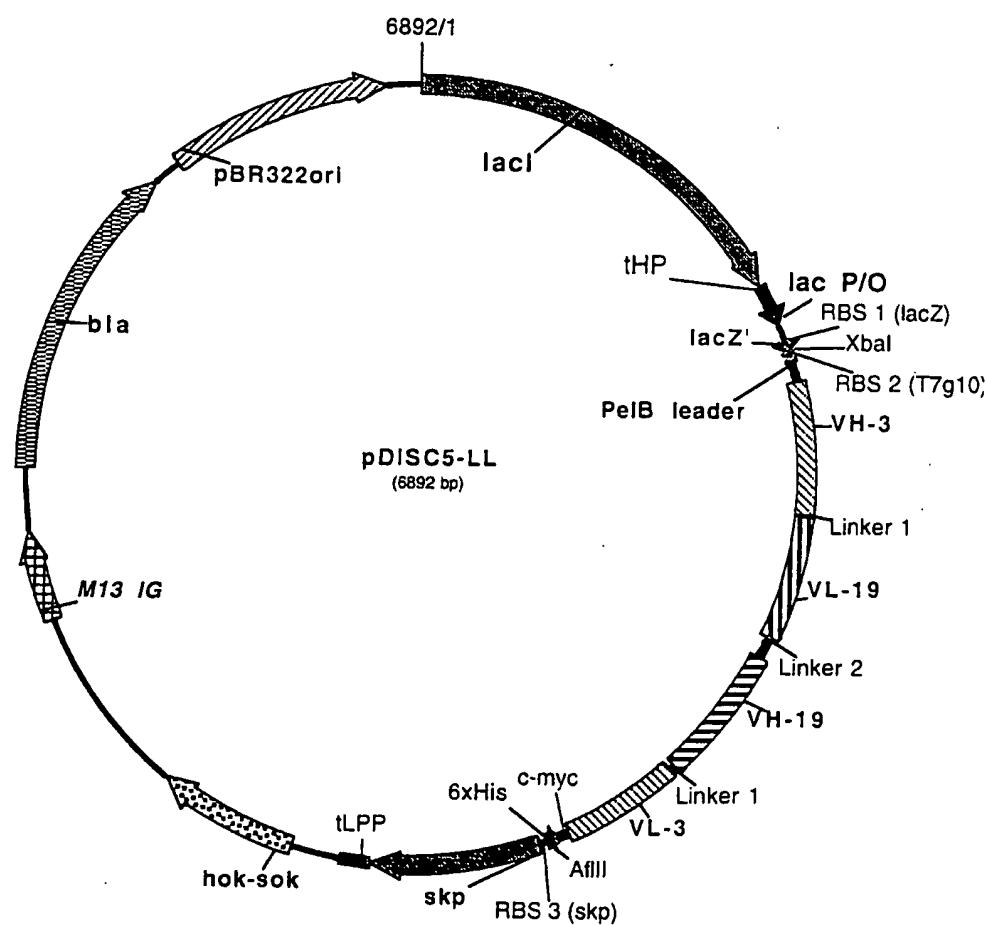
8 / 10

FIGUR 8

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

9/10

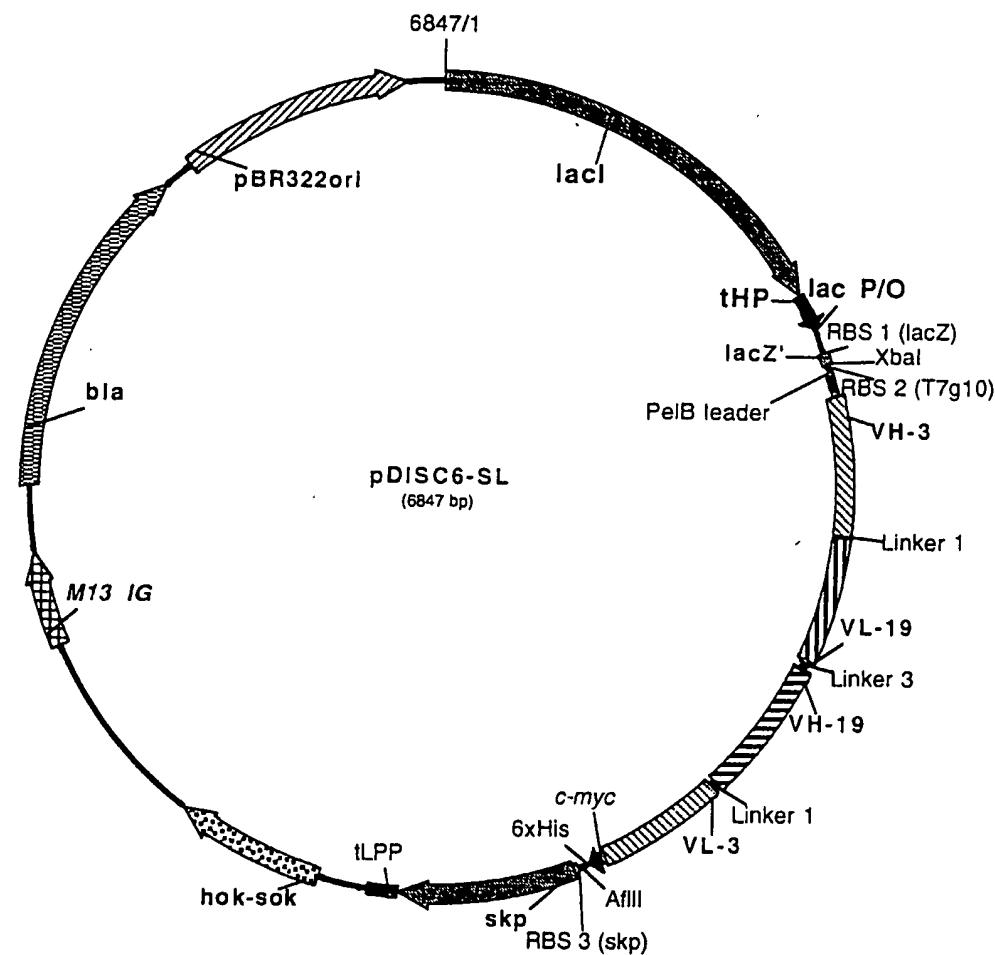


FIGUR 9

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

10/10



FIGUR 10

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

1

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Multivalente Antikörper-Konstrukte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 28..1689

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 28..1689

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala

1

5

51

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

2

GCC GCT GGC TTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val 10 15 20	99
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val 25 30 35 40	147
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met 45 50 55	195
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr 60 65 70	243
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp 75 80 85	291
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA Lys Ala Thr Leu Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 90 95 100	339
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 105 110 115 120	387
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr 125 130 135	435
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 140 145 150	483
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg 155 160 165	531
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp 170 175 180	579
AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 185 190 195 200	627
CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe 205 210 215	675
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val 220 225 230	723

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

3

GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp 235 240 245	771
CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp 250 255 260	819
GCT GCG GCC GCT GGT GGT GGT TCT GGC GGC GGT GGT AGC GGT GGT Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly 265 270 275 280	867
GGC GGC TCC GGT GGT AGC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly 285 290 295	915
GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala 300 305 310	963
TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg 315 320 325	1011
CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT GGT Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly 330 335 340	1059
GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT GCA Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala 345 350 355 360	1107
GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA TCT Asp Glu Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser 365 370 375	1155
GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG GTA Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Val 380 385 390	1203
GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val 395 400 405	1251
ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC GTG Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val 410 415 420	1299
CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val 425 430 435 440	1347
ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG TAC Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr 445 450 455	1395

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

4

CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser 460 465 470	1443
AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT GGG Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly 475 480 485	1491
ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala 490 495 500	1539
ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser 505 510 515 520	1587
GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA TCC Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser 525 530 535	1635
GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT CAC Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His 540 545 550	1683
CAT CAC TAATCTAGA His His	1698

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 554 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu 20 25 30
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly 35 40 45
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly 50 55 60
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr 65 70 75 80

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

5

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
145 150 155 160

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
165 170 175

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
195 200 205

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
225 230 235 240

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
275 280 285

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
290 295 300

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
305 310 315 320

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
325 330 335

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
340 345 350

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
355 360 365

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

6

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 1653 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
 - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
 - iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 - (iv) ANTISENSE: NEIN

 - (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 28..1644

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

7

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE: 28..1644

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCATTA AAGAGGGAGAA ATTAAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala	51
1 5	
GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val	99
10 15 20	
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG Gln Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val	147
25 30 35 40	
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met	195
45 50 55	
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	243
60 65 70	
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp	291
75 80 85	
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA Lys Ala Thr Leu Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln	339
90 95 100	
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	387
105 110 115 120	
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	435
125 130 135	
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile	483
140 145 150	
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	531
155 160 165	
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp	579
170 175 180	

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

8

AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 185 190 195 200	627
CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe 205 210 215	675
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val 220 225 230	723
GAG AAG GTG GAT GCT GCA ACC TAT CAC TGT CAG CAA AGT ACT GAG GAT Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp 235 240 245	771
CCG TGG ACG TTC GGT GGA GCC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG GCT GAT Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp 250 255 260	819
GCT GCG GCC GCT GGT GGC CCA GGG TCG CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT Ala Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser 265 270 275 280	867
GGG GCT GAG CTG GTG AGG CCT GGG TCC TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys 285 290 295	915
GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TAC TGG ATG AAC TGG GTG AAG CAG Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln 300 305 310	963
AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CAG ATT TGG CCT GGA GAT Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp 315 320 325	1011
GGT GAT ACT AAC TAC AAT GGA AAG TTC AAG GGT AAA GCC ACT CTG ACT Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr 330 335 340	1059
GCA GAC GAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTA GCA Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala 345 350 355 360	1107
TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA CGG GAG ACT ACG ACG Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr 365 370 375	1155
GTA GGC CGT TAT TAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA Val Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser 380 385 390	1203
GTC ACC GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 395 400 405	1251

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

9

GTG CTC ACT CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys 410 415 420	1299
GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG AAC TGG Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp 425 430 435 440	1347
TAC CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr 445 450 455	1395
TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser 460 465 470	1443
GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala 475 480 485	1491
GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly 490 495 500	1539
TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly 505 510 515 520	1587
TCC GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His 525 530 535	1635
CAC CAT CAC TAATCTAGA His His His	1653

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu 20 25 30
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly 35 40 45

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

10

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
50 55 60

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
65 70 75 80

Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
85 90 95

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
100 105 110

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
145 150 155 160

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
165 170 175

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
195 200 205

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
225 230 235 240

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr
245 250 255

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly
260 265 270

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
275 280 285

Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
290 295 300

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
305 310 315 320

Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
325 330 335

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

11

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 340 345 350

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 355 360 365

Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 370 375 380

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 405 410 415

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 420 425 430

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 435 440 445

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 450 455 460

Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 465 470 475 480

Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 485 490 495

Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 500 505 510

Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 515 520 525

Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His His
 530 535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGTGAATTC CAGGTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 348 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

13

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..348

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE:1..348

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser 1 5 10 15	48
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln 20 25 30	96
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe 35 40 45	144
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu 50 55 60	192
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val 65 70 75 80	240
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG GTG CAA CTG CAG Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln 85 90 95	288
CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser 100 105 110	336
TGC AAG GCT TCT Cys Lys Ala Ser 115	348

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

14

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met	Arg	Phe	Pro	Ser	Ile	Phe	Thr	Ala	Val	Leu	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser
1					5				10					15	

Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Glu	Asp	Glu	Thr	Ala	Gln
					20			25					30		

Ile	Pro	Ala	Glu	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr	Ser	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Phe
					35			40					45		

Asp	Val	Ala	Val	Leu	Pro	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu
					50			55					60		

Phe	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Glu	Glu	Gly	Val
					65			70			75			80	

Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala	Glu	Phe	Gln	Val	Gln	Leu	Gln
					85				90					95	

Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser
					100				105					110	

Cys	Lys	Ala	Ser												
			115												

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

- (iv) ANTISENSE: NEIN

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE:1..354

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
 (B) LAGE:1..354

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	48
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	96
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	144
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	192
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	240
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC ATG GCG CAG GTG CAA Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln	288
85 90 95	
CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys	336
100 105 110	
ATG TCC TGC AAG GCT TCT Met Ser Cys Lys Ala Ser	354
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 118 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
      1           5           10          15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
      20          25          30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
      35          40          45

```

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

16

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
 85 90 95

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 100 105 110

Met Ser Cys Lys Ala Ser
 115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTAA CC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

17

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTGCG

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAAACT CCA

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

WO 99/57150

PCT/DE99/01350

18

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC

60

GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG

102

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.